

# 舟山海域好氧不产氧光合异养细菌群落结构分析\*

赵本宣<sup>1,2</sup> 赵 晟<sup>1,2</sup> 李汝伟<sup>1,2</sup> 刘 强<sup>1,2</sup> 吴常文<sup>1,2</sup>①

(1. 浙江海洋大学 舟山 316022; 2. 国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316022)

**摘要** 好氧不产氧光合异养细菌(aerobic anoxygenic phototrophic bacteria, AAPB)是广泛分布在各种海洋环境中并在微生物生态学、海洋碳汇和海洋生态系统的生物地球化学循环的过程中具有潜在的重要作用的一类光合异养微生物。于 2016 年 4 月份在舟山群岛不同海洋功能区海域的八个站点采集表层海水,基于编码光合反应复合中心小亚基的 *pufM* 基因进行高通量测序,对测序结果进行分析,结果发现:除了岱山的样品测序失败以外,其它七个站点共得到 192633 条序列,我们进行了 OTU 聚类分析,相似性设为 97%,可以看到,所有的数据最后一共分成 4051 个 OTU。属于 Proteobacteria 的 AAPB 占明确分类的各细菌门的 97%。Rhodobacteraceae 科的 *Loktanella* 和 *Roseobacter* 两个属的 AAPB 在所有的采样站点中都处于优势地位。*Desulfocapsa* 属在朱家尖站位(ZJJ)的发现非常具有研究价值,在以往的研究中还没有出现过。研究结果表明,在舟山群岛不同功能海域 AAPB 的群落结构和分布情况也是有差别的,而且与很多环境因素有关,这可以解释为什么目前很难准确预测水生环境总 AAPB 分布的问题。

**关键词** 好氧不产氧光合异养细菌(AAPB); 高通量测序; 多样性

**中图分类号** Q178.1 **doi:** 10.11693/hyhz20160900199

好氧不产氧光合异养细菌(aerobic anoxygenic phototrophic bacteria, AAPB)作为地球上最古老的细菌类群之一,在严格需氧的前提下,能够利用自身合成的细菌叶绿素 *a* 捕获光能作为辅助为新陈代谢提供部分能量(Yurkov *et al.*, 1998a, b; Rathgeber *et al.*, 2004; Cooney *et al.*, 2006; Koblížek *et al.*, 2006; Moran *et al.*, 2007),这样就间接地减少了有机碳的消耗,从而就相应地减少了二氧化碳的释放,而且 AAPB 广泛地分布在海洋真光层,最新研究表明,光可以激发并促进 AAPB 的细胞活性,促进碳循环过程的进行(Garcia-Chaves *et al.*, 2016);同时又由于它在海洋生物量中占有重要比重,并在碳和其它生源要素的生物地球化学循环的过程中起着独特的作用(Shiba *et al.*, 1982; Hallin *et al.*, 2005),具有潜在的重要功能,因此 AAPB 就成为了海洋微生物生态研究领域的“新宠”。

AAPB 生存环境极其多样,从海洋到淡水,从盐

湖、碱性湖泊、淡水温泉(Nuyanzina-Boldareva *et al.*, 2016)到南极湖泊,从酸性矿的排水系统到土壤,甚至在海底热泉和植物叶片上都有它的踪迹(Labrenz *et al.*, 2005; Csotonyi *et al.*, 2010; Atamna-Ismaeel *et al.*, 2012)。在海洋环境中,它们普遍占总原核生物 1%—3%的丰度(Schwalbach *et al.*, 2005),在沿岸海域和公海都有发现,包括苦咸水中(Cottrell *et al.*, 2006, 2009, 2010)。AAPB 的丰度上下波动很大(Kolber *et al.*, 2000; Goericke, 2002),在一些沿海的河口区 AAPB 的丰度戏剧性地超过了 10% (Schwalbach *et al.*, 2005; Waidner *et al.*, 2005),最高竟然达到 34% (Waidner *et al.*, 2007)。在一些高山湖泊中的比例甚至超过了 50% (Mašin *et al.*, 2008)。Kolber 等(2000, 2001)和 Beatty(2005)等人率先对海洋中 AAPB 的分布规律进行了研究,其研究结果表明 AAPB 广泛分布在海洋中,此外,其定量结果显示 AAPB 的光合能力在贫营养的

\* 浙江省自然科学基金项目, LY15D060006 号; 科技部国际科技合作项目, 2015DFR30450 号。赵本宣, 硕士研究生, E-mail: zbx515@163.com

通讯作者: 吴常文, 教授, E-mail: wucw2013@126.com

收稿日期: 2016-09-19, 收修改稿日期: 2016-10-19

大洋海域更具生存优势,这意味着 AAPB 的丰度和多样性会随环境中营养丰富程度的提高而降低,反之亦然。而 Goericke(2002)等在南加利福尼亚沿岸的富营养、中营养和贫营养水域的对比研究却得出与 Kolber 等人相反的结论。有人在泥炭沼泽湖泊中研究发现,在 pH 为 6.7—7.6 之间时, AAPB 的丰度最高(Lew *et al.*, 2016)。因此,目前 AAPB 在初级生产力中的地位还不能够完全明确,而且影响 AAPB 分布格局及其在海洋生物生产和物质循环中生态地位的机制或许要比预期的更加复杂(胡耀华, 2006),只有从季节、年度尺度上对全球多个典型海区的广泛的自然生态学调查,获取更充分、更具代表性的第一手数据,才能全面、准确地评估 AAPB 在海洋中的生态地位。

基于基因组和其它单基因位点的证据表明, AAPB 和厌氧光合细菌一样也含有细菌叶绿素,它们是按功能分类的一类属于变形菌门的细菌(Yurkov *et al.*, 1998a, b; Bryant *et al.*, 2006)。早期发现的大部分 AAPB 都来源于海洋环境,在进化上都属于  $\alpha$ -Proteobacteria,而唯一属于  $\beta$ -Proteobacteria 的 AAPB 来自于淡水环境(Suyama *et al.*, 1999),基于环境序列的分析表明海洋未可培养细菌中还存在着类似  $\beta$ -Proteobacteria 的 AAPB (Béjà *et al.*, 2002)。而最近的研究表明在近岸海洋表层微生物群落中  $\gamma$ -Proteobacteria 也占有相当的比重(Hu *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2007)。基于可培养和非培养的研究表明 AAPB 具有属于  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  分支的广泛的遗传多样性,这些研究都扩展了 AAPB 的多样性(Salka *et al.*, 2008)。由于海洋环境中绝大多数细菌都是未可培养的,必然还会存在许多稀有的、目前还不为人知的 AAPB 种类。前人研究表明,基于 16S rRNA 的基因序列与 *pufM* 基因的序列分析结果所得到的 AAPB 系统发育关系不完全一致,这说明光合作用的超级操纵子的侧向迁移产生了高度多样化的 AAPB 群落(Nagashima *et al.*, 1997; Yurkov *et al.*, 1998a, b)。像 16S rRNA 基因, *pufM* 基因存在于所有的 AAPB 中,具有保守区和可变区,使其成为一个很好的用于量化的丰度和评估 AAPB 的遗传多样性的分子标记(Achenbach *et al.*, 2001; Allgaier *et al.*, 2003)。由编码光合反应中心 M 亚基的 *pufM* 基因所设计出来的引物被广泛地用来扩增来自不同环境的样品,作为研究 AAPB 基因多样性的最常用的方法(Yutin *et al.*, 2005)。

对整个大西洋和太平洋的观测证据表明, AAPB 的丰度和多样性沿环境梯度而改变。例如,沿海和咸

水似乎具有独特的 AAPB 分支,而在开放的海洋中却未发现(Yutin *et al.*, 2007)。同样,具有更高生产力的水域,正如高叶绿素 *a* 浓度所指示的, AAPB 多样性比贫营养水域要低(Jiao *et al.*, 2007)。相反,在一些主要的出海口定的采样位置自由生活与颗粒附着 AAPB 之间不存在显著差异,但采样点之间却存在遗传多样性的显著差异(Cottrell *et al.*, 2010)。来自波罗的海不同位置的细菌样间存在 AAPB 实质性的遗传变异,包括两个淡水和咸水分支(Masín *et al.*, 2006; Salka *et al.*, 2008),进一步表明 AAPB 的遗传多样性,并且这种多样性具有与环境变量相关的生物地理和潜在的系统地理格局。已有的结果表明,尽管环境变化可能很重要,但也可能是特有的 AAPB 与原有岛屿生物地理学的一些假设一致(Losos, 1967),即使没有明显限制它们悬浮分散在海洋中,这表明地理的距离可能在这些微生物种群的生态结构中发挥重要作用。而 AAPB 群体遗传多样性也与环境变量和位置相关,表明种群数量和遗传多样性是通过环境变量和特有机制的组合进行调节的(Ritchie *et al.*, 2012)。

舟山群岛海域是东海地区集旅游、港口、工业、渔业、养殖区等于一体的重要海域。根据舟山市海洋功能区划,结合岛礁分布和行政区划,在基本涵盖舟山所有功能海域的基础上,我们选择了 8 个典型站位。本文针对这 8 个典型站位的表层海水样品,基于高通量 DNA 测序的方法,利用编码光合反应复合中心小亚基的 *pufM* 基因构建文库,对 AAPB 分布及其系统发育多样性进行分析,旨在初步探讨舟山群岛海域 AAPB 的多样性情况,为今后舟山群岛 AAPB 生态学角色及其在碳循环中的贡献奠定科学基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集及预处理

于 2016 年 4 月在舟山群岛海域选择 8 个代表性站位,采样点的选择依据舟山市海洋功能区划和行政区划相结合的原则,采样站位为东极岛(DJ)(122.69°E, 30.19°N)、岱山(DS)(122.11°E, 30.27°N)、沈家门(SJM)(122.32°E, 29.94°N)、枸杞岛(GQ)(122.81°E, 30.72°N)、金塘岛(JT)(121.85°E, 30.07°N)、六横岛(LH)(122.11°E, 29.79°N)、桃花岛(TH)(122.30°E, 29.81°N)、朱家尖(ZJJ)(122.41°E, 29.92°N),见图 1。采集表层(0.5m)海水样品各 2L 装入预先灭过菌的聚乙烯采样瓶中,先用真空抽滤装置经 3  $\mu$ m 孔径滤膜过滤去除大颗粒杂质,再用

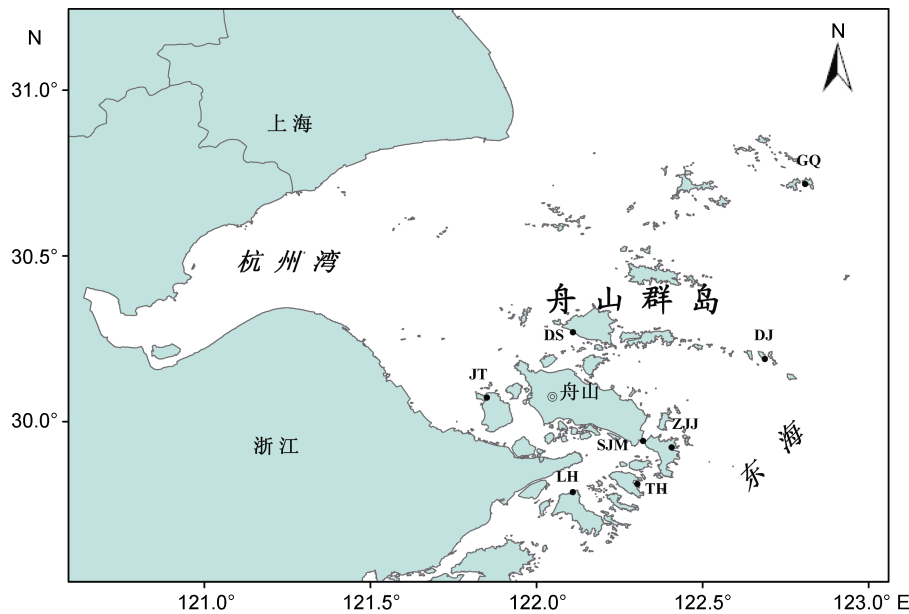


图 1 调查海区及采样站位(东海舟山群岛海域)

Fig.1 Location of the study area and sampling stations in the Zhoushan Archipelago, the East China Sea

注: 东极岛(DJ), 枸杞岛(GQ), 金塘岛(JT), 六横岛(LH), 沈家门(SJM), 桃花岛(TH), 朱家尖(ZJJ), 岱山(DS)。样品采集于 2016 年 4 月 8—30 日

0.22 $\mu$ m 孔径滤膜过滤, 然后将滤膜取出, 放入已灭菌的含有石英砂的 5mL 离心管中, 于液氮中保存, 用于细菌 DNA 提取。

## 1.2 环境参数测定

在水样采集的同时, 利用携带的便携式 HQ-30D 溶氧仪测定溶解氧和温度, 盐度计和 pH 计分别测定盐度和 pH, 总磷使用便携多参数水质分析仪(型号: 5B-2H)进行测定, 其它一些水质参数, 如 COD、氨氮、硫酸盐、磷酸盐、硅酸盐、亚硝酸盐和硝酸盐等使用 Smartchem-200 全自动间断式化学分析仪进行测定。

## 1.3 DNA 的提取及检测

将保存滤膜的 5mL 离心管从液氮中取出, 在无菌的条件下, 剪碎, 加入 1mL 提取缓冲液, 水样中细菌 DNA 具体提取步骤参照美国 MOBIO 公司强力水样 DNA 提取试剂盒的说明书, 并用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 1.4 AAPB *pufM* 基因 PCR 扩增

采样针对不产氧光合细菌 *pufM* 基因扩增引物 (Achenbach *et al.*, 2001; Béjà *et al.*, 2002) *pufM*-557-f (5'-TACGSAACCTGTWCTAC-3') 和 *pufM*-750-r (5'-CCATSGTCCAGCGCCAG AA-3'), 对样品基因组 DNA 进行扩增, PCR 产物片段长度约为 193bp。PCR 反应体系为 95 $^{\circ}$ C 预变性 4min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 58 $^{\circ}$ C 退

火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。20 $\mu$ L 反应混合液, 包括 2 $\mu$ L DNA, 正反引物各 0.7 $\mu$ L, 10 $\mu$ L 的 PCR mastermix (TaKaRa), 用水补齐。扩增产物用 1.5% (W/V) 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增效果。

## 1.5 样品的高通量测序及数据分析流程

将样品的 PCR 产物, 送至上海翰宇生物科技有限公司在 Illumina MiSeq<sup>TM</sup> 平台上进行高通量测序。为了提高分析结果的质量, 在序列充足的同时, 也要保证序列的质量, 因此, 分析前要先对原始数据进行过滤处理, 得到优质序列。然后对优质序列进行 OTU 聚类分析。基于 OTU 聚类分析结果, 可以进行 Alpha 多样性分析, 根据 OTU 的物种分类结果, 可以进行群落结构的统计分析。将 OTU 和分类学信息结合在一起进行 Beta 多样性分析。在提供了环境因子的情况下, 可以进行多样性统计分析。

数据预处理, 使用 Mothur v.1.32.1 (Schloss *et al.*, 2009) (<http://www.mothur.org/wiki/Calculators>) 对原始数据进行处理, 得到优质序列, 并进行统计。使用 QIIME (Caporaso *et al.*, 2010) 聚类生成 OTU, 相似性设为 97%, 即任意两条 reads 的相似度均达到 97% 以上, 将该序列聚类为一个 OTU。OTU 代表序列与 NCBI nr 数据库 BlastX 比对, 得到每个 OTU 的分类学信息。

本研究中所有的原始数据全部上传到 NCBI-SRA

数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRP080714>), 登录号为 ID: SRP080714。

## 2 实验结果

### 2.1 环境参数

现场进行定位, 采集表层海水, 采样深度为 0.5m, 溶解氧(DO)、盐度、pH、温度现场测定, 其它

水质参数, 如 COD、总磷、溶解无机氮(DIN)等带回实验室立即进行检测, 结果如表 1 所示。从结果可以看出, 水温为 13.8—17.2℃; 溶解氧(DO)变化不大, 为 10.00—11.85; pH 范围在 7.65—7.92; 盐度变化较大, 20—33, 金塘最低, 东极最高; COD 含量都符合一类海水的标准; 无机氮含量桃花岛最高, 为 0.438mg/L, 总磷枸杞岛最低, 只有 0.008mg/L。

表 1 采样点环境参数  
Tab.1 The environmental parameters of each sampling station

| 站点  | 经度       | 纬度      | 温度( ) | pH   | 溶解氧<br>DO(mg/L) | 盐度 | 化学需氧量<br>COD(mg/L) | 无机氮<br>(mg/L) | 总磷<br>TP(mg/L) |
|-----|----------|---------|-------|------|-----------------|----|--------------------|---------------|----------------|
| DJ  | 122.69°E | 30.19°N | 14.5  | 7.86 | 10.39           | 33 | 1.14               | 0.061         | 0.030          |
| SJM | 122.32°E | 29.94°N | 13.8  | 7.78 | 10.44           | 30 | 0.97               | 0.174         | 0.038          |
| GQ  | 122.81°E | 30.72°N | 14.7  | 7.92 | 11.85           | 32 | 1.04               | 0.053         | 0.008          |
| DS  | 122.11°E | 30.27°N | 13.9  | 7.77 | 10.46           | 27 | 0.59               | 0.121         | 0.036          |
| ZJJ | 122.41°E | 29.92°N | 15.4  | 7.65 | 10.61           | 30 | 1.02               | 0.211         | 0.014          |
| JT  | 121.85°E | 30.07°N | 15.7  | 7.67 | 10.00           | 20 | 1.08               | 0.078         | 0.029          |
| LH  | 122.11°E | 29.79°N | 17.2  | 7.71 | 10.01           | 26 | 1.09               | 0.088         | 0.020          |
| TH  | 122.30°E | 29.81°N | 16.7  | 7.83 | 10.78           | 27 | 1.18               | 0.438         | 0.018          |

注: 温度(T), 溶解氧(DO), 盐度(salinity), 化学需氧量(COD), 无机氮(DIN), 总磷(TP)。东极岛(DJ), 枸杞岛(GQ), 金塘岛(JT), 六横岛(LH), 沈家门(SJM), 桃花岛(TH), 朱家尖(ZJJ), 岱山(DS)

### 2.2 OTU 聚类和 Alpha 多样性

经过预处理的原始测序数据, 一共得到 192633 条序列, 我们进行了 OTU 聚类分析, 相似性设为 97%, 可以看到, 所有的数据最后一共分成 4051 个 OTU, 各站点 OTU 聚类结果分别是 DJ 490 个, GQ 670 个, JT 1123 个, LH 883 个, SJM 1526 个, TH 1204 个, ZJJ 691 个(表 2)。

进行 Alpha 多样性分析, Alpha 多样性指数(estimator), 包括: 丰度评估指数(ACE 指数和 Chao 1 指数)和多样性评估指数(Shannon 指数、Simpson 指数和 Coverage)。从 ACE 指数和 Chao 1 指数的结果可以看出, 各采样站点微生物丰富度排序是: SJM > ZJJ

> TH > JT > LH > GQ > DJ, 而从 Shannon 指数和 Simpson 指数来看, 各站点微生物多样性从高到低依次是: SJM > LH > JT > TH > ZJJ > DJ > GQ。从 Coverage 可以看出, 测序深度已经足够, 覆盖度较高, 文库可用于评估 AAPB 多样性。从稀释性曲线(图 2)来看当测序量超过 25000 读长时, 仍然有新的 OTU 被发现, 但是整个曲线已经趋于平缓, 说明测序数据量合理, 更多的数据量对发现新 OTU 的边际贡献很小, 从图中也可以看出相同序列数时, SJM、TH 和 JT 的 OTU 数比其它三个位点要高, DJ 最低, 说明 SJM、TH 和 JT 的微生物丰富度要高于其它三个位点, DJ 的微生物丰富度最低。

表 2 样品 OTUs(cutoff=0.03)聚类和 Alpha 多样性指数情况  
Tab.2 The OTUs and the estimators of each sample (cutoff=0.03)

| Sample | Cutoffs | OTUs | ACE      | Chao 1   | Shannon | Simpson | Coverage |
|--------|---------|------|----------|----------|---------|---------|----------|
| DJ     | 0.03    | 490  | 2272.419 | 1285.344 | 1.003   | 0.709   | 0.987    |
| GQ     | 0.03    | 670  | 2346.805 | 1480.843 | 0.935   | 0.726   | 0.985    |
| JT     | 0.03    | 1123 | 2986.873 | 2201.553 | 3.587   | 0.156   | 0.979    |
| LH     | 0.03    | 883  | 2517.865 | 1697.963 | 3.686   | 0.132   | 0.981    |
| SJM    | 0.03    | 1526 | 4639.57  | 3161.734 | 4.126   | 0.087   | 0.967    |
| TH     | 0.03    | 1204 | 3773.191 | 2482.62  | 1.849   | 0.464   | 0.976    |
| ZJJ    | 0.03    | 691  | 4008.149 | 2392.211 | 1.661   | 0.502   | 0.971    |

注: 东极岛(DJ), 枸杞岛(GQ), 金塘岛(JT), 六横岛(LH), 沈家门(SJM), 桃花岛(TH), 朱家尖(ZJJ)

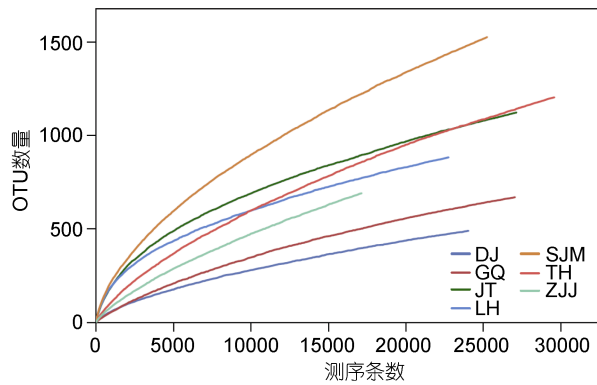


图2 稀释性曲线(cutoff=0.03)

Fig.2 The rarefaction curve (cutoff=0.03)

注: 横轴为从某个样品中随机抽取的测序条数, 纵轴为基于该测序条数能构建的 OTU 数量。每条曲线代表一个样品, 用不同颜色标记。东极岛(DJ), 枸杞岛(GQ), 金塘岛(JT), 六横岛(LH), 沈家门(SJM), 桃花岛(TH), 朱家尖(ZJJ)

### 2.3 AAPB 群落组成

根据 OTU 聚类分析的结果, 各采样站点样品中 AAPB 群落结果组成基本相似, 大部分序列都属于未明确分类的细菌, 明确分类的门主要包括: Planctomycetes 浮霉菌门, Proteobacteria 变形菌门, Firmicutes 厚壁菌门。AAPB 在门水平上的组成分布与前人报道的结果相似(陈晨, 2014), 但是有关 Planctomycetes 的发现还不是很多。其中, Proteobacteria 占已明确分类的细菌类群的绝对优势, 各站点中序列数目分别是 DJ 150 个, GQ 43 个, JT 230 个, LH 819 个, SJM 195 个, TH 89 个, ZJJ 86 个, 最多

的是 LH, 其次是 JT, 最少的是 GQ。Firmicutes 只在 JT 和 ZJJ 发现了, Planctomycetes 仅在 ZJJ 检测到 1 条序列。在明确分类的各细菌门中, 属于 Proteobacteria 的 AAPB 占到总体的 97%。

各站点聚类分析结果中未明确分类的 AAPB 占大多数, 一共发现了 32 个明确分类的属, 明确分类的属分类水平的分布情况见图 3, 其中占优势的菌属分别为 *Roseobacter*、*Sphingopyxis*、*Loktanella*、*Sphingomonas*、*Methylobacterium* 和 *Escherichia*, 其中前三个是所有站点共有的属。其它还包括 *Skermanella*、*Brevundimonas*、*Thalassobium*、*Bacillus*、*Isosphaera*、*Ahrensia*、*Maritimibacter*、*Rhodobacter*、*Sulfitobacter*、*Elioraea*、*Erythrobacter*、*Blastomonas*、*Citromicrobium*、*Novosphingobium*、*Limnohabitans*、*Rubrivivax*、*Methyloversatilis*、*Desulfocapsa*、*Thiohalocapsa*、*Thiorhodococcus*、*Klebsiella*、*Amphritea*、*Cellvibrio*、*Pseudomonas* 和 *Cycloclasticus*。有些属只在某一个位点或其中几个位点发现, 例如, *Isosphaera*、*Maritimibacter*、*Desulfocapsa*、*Thiorhodococcus*、*Klebsiella* 和 *Amphritea* 只存在于 ZJJ, *Ahrensia*、*Blastomonas* 和 *Methyloversatilis* 仅在 JT 发现, *Sulfitobacter* 和 *Elioraea* 是 LH 特有的两个属, 而 *Novosphingobium* 是 TH 的特有属, *Limnohabitans* 和 *Rubrivivax* 也仅在 SJM 检测到。总的来说, 各位点明确分类的 AAPB 丰度大小顺序是 LH>JT>SJM>DJ>TH>ZJJ>GQ。

表3 门水平分类结果

Tab.3 The taxonomy in phylum for AAPB in each station

| Taxonomy 分类                   | DJ    | GQ    | JT    | LH    | SJM   | TH    | ZJJ   |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Bacteria; Planctomycetes 浮霉菌门 | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 0     | 1     |
| Bacteria; Proteobacteria 变形菌门 | 150   | 43    | 230   | 819   | 195   | 89    | 86    |
| Bacteria; unclassified 未分类的   | 23897 | 27006 | 26880 | 21940 | 25054 | 29500 | 17046 |
| Bacteria; Firmicutes 厚壁菌门     | 0     | 0     | 34    | 0     | 0     | 0     | 12    |

注: 数字代表的是各站点对应的各细菌门的序列数量。东极岛(DJ), 枸杞岛(GQ), 金塘岛(JT), 六横岛(LH), 沈家门(SJM), 桃花岛(TH), 朱家尖(ZJJ)

### 2.4 AAPB 群落相似性分析

从属水平的样品间聚类关系树(图 4)可以看出, 各采样位点之间的群落结构相似性, 其中 LH 和 SJM 相似性较高, DJ 和 GQ 相似性最高, 然后 TH 和 DJ、GQ 两个比较相似, ZJJ 又和 DJ、GQ 和 TH 相似性较高, JT 和其它位点相似性是最底的。Heatmap 图可以很直观的反映各位点在 AAPB 属水平上群落组成的

相似性和差异性(图 5)。横轴代表各采样位点, 纵轴代表 AAPB 各属, 在 JT 站点, *Bacillus* 和 *Erythrobacter* 丰度较高, 而 *Roseobacter* 丰度相对较低, TH 站点, *Sphingopyxis*、*Loktanella* 和 *Roseobacter* 具有较高丰度, GQ 主要是未明确分类的一些属。可以发现, 单独分析某一个属的时候, 各站点差别仍然很明显, 比如: *Roseobacter* 相对丰度最高的是 LH, DJ 和 ZJJ 相对丰

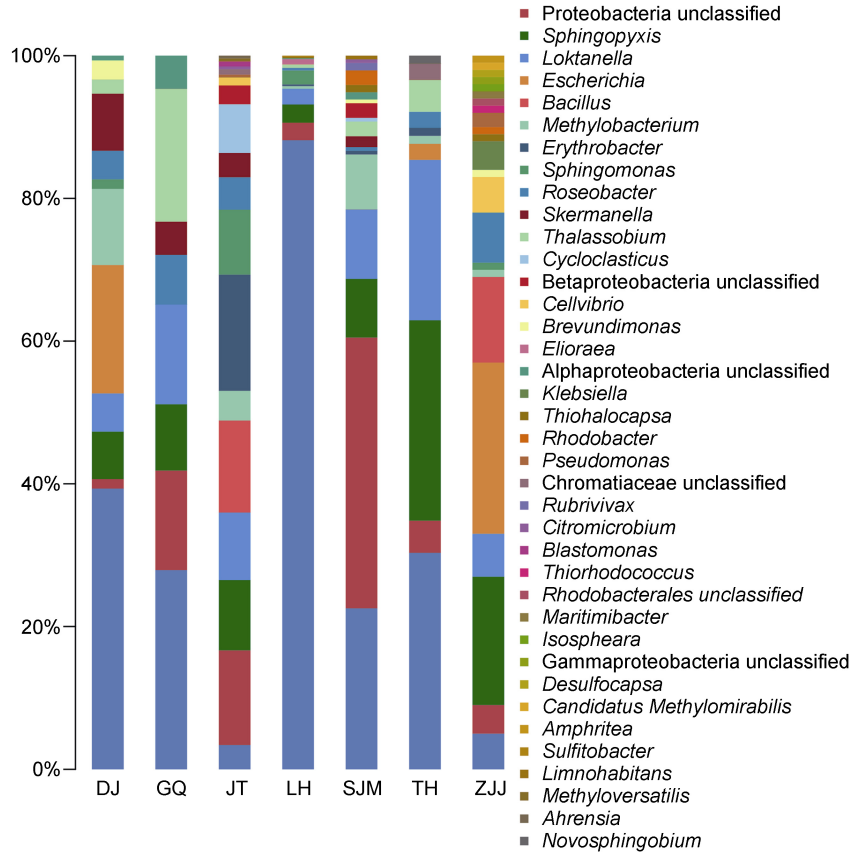


图 3 明确分类的各属的相对丰度

Fig.3 Relative abundance of each clear classification genus retrieved from metagenomic samples  
注: 东极岛(DJ), 枸杞岛(GQ), 金塘岛(JT), 六横岛(LH), 沈家门(SJM), 桃花岛(TH), 朱家尖(ZJJ)

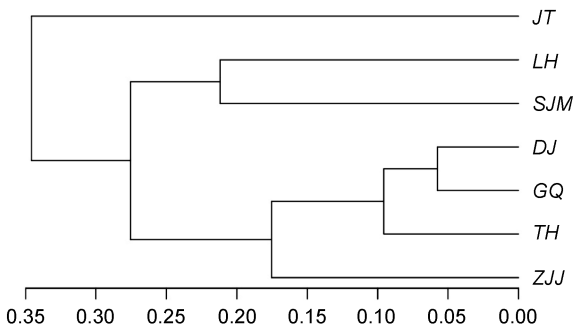


图 4 样品间聚类关系树(属水平)

Fig.4 The tree of clustering for all samples at genus level  
注: 下角的图例为距离标尺, 分支距离越长, 差异关系越远。东极岛(DJ), 枸杞岛(GQ), 金塘岛(JT), 六横岛(LH), 沈家门(SJM), 桃花岛(TH), 朱家尖(ZJJ)

度比较高的都是 *Escherichia*, 在 DJ 和 SJM, *Methylobacterium* 的丰度相对较高, *Bacillus* 在 JT 和 ZJJ 的分布则相对较多。同样又印证了 LH 和 SJM 具有较高相似性, ZJJ、DJ、GQ 和 TH 相似性比较近, 而 JT 与其它位点差异性是最大的。

RDA 用于探究的 AAPB 丰度和环境变量之间的关系。不难发现, 溶解氧 (DO) 和 pH 对于除 *Roseobacter* 和 *Escherichia* 之外的 AAPB 各属细菌均呈正相关性关系, 而其它的环境变量如 COD、总磷 (TP)、温度 (T)、无机氮 (DIN) 和盐度 (salinity) 对 *Roseobacter* 和 *Escherichia* 呈正相关性关系。溶解氧 (DO)、总磷 (TP) 和 pH 射线较长, 说明这三种因素对相应的 AAPB 影响较大, 相关性比较明显 (图 6)。

### 3 讨论与结论

本研究的目的是确定在舟山群岛海域不同海洋功能区表层海水之间 AAPB 群落组成的异同并进一步探究 AAPB 与环境因子之间的关系。我们推测舟山群岛 AAPB 的组成类型将有可能既表现出特有性又具有世界大同主义的细菌群落的格局。

所有的测序结果按照 97% 的相似值, 一共归为 4051 个 OTU 中, 每个采样站点的 OTU 数不等, 为 490—1526 个。其中, 有 28 个 OTU 是所有站点共有



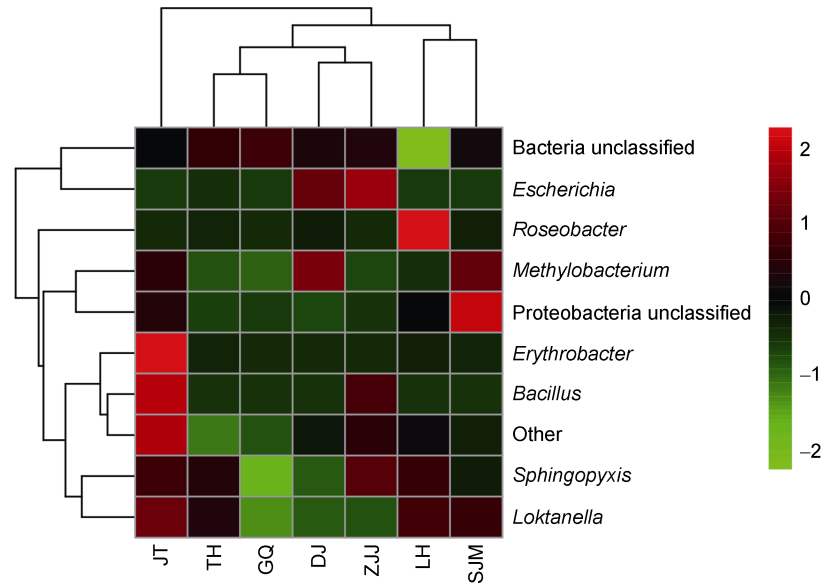


图 5 AAPB 属水平的 Heatmap 图

Fig.5 The Heatmap of AAPB in the sampling stations at genus level

注: 每小格代表其所在样品中某个物种的相对丰度, 颜色对应的是最上面的色阶, 不同颜色代表物种所占比例, 从绿到红, 代表该样本横坐标的丰度越高。东极岛(DJ), 枸杞岛(GQ), 金塘岛(JT), 六横岛(LH), 沈家门(SJM), 桃花岛(TH), 朱家尖(ZJJ)

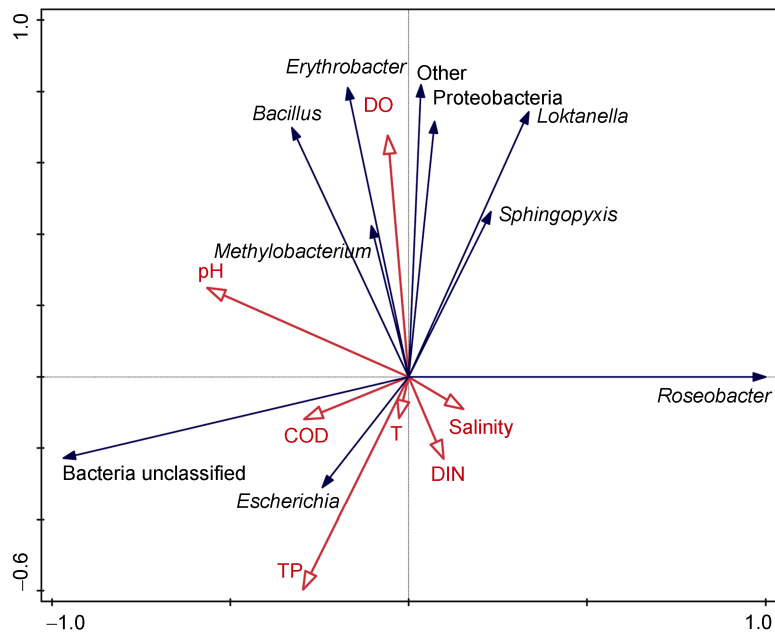


图 6 AAPB 与环境参数之间关系的 RDA 分析

Fig.6 Ordination plot of redundancy analysis (RDA) for AAPBs with hydrochemical data (environmental variables)

注: 温度(T), 溶解氧(DO), 盐度(salinity), 化学需氧量(COD)无机氮(DIN)总磷(TP)。东极岛(DJ), 枸杞岛(GQ), 金塘岛(JT), 六横岛(LH), 沈家门(SJM), 桃花岛(TH), 朱家尖(ZJJ)

的, 并且所含序列数占总测序条数的 70%。基于 OTU 聚类分析的结果, 我们计算了每个样品的  $\alpha$  多样性指数(表 2)。7 个站点独有的 OTU 数目分别是 DJ 10 个、GQ 14 个、JT 14 个、LH 17 个、SJM 33 个、TH 24 个、ZJJ 28 个。Chao 1 和 ACE 指数通常用来计算

丰富度情况, 而 Shannon 和 Simpson 指数, 被用来估计多样性。结果表明, 多样性是排名为: SJM > LH > JT > TH > ZJJ > DJ > GQ, 而丰富度排名为: SJM > ZJJ > TH > JT > LH > GQ > DJ。在各种样品中 OTU 的变化中也观察到类似的趋势。稀释性曲线很好地展

示了各样品测序的情况,此外结合 Alpha 多样性指数,可以得出结论: SJM 微生物丰富度和多样性都是最高的, LH、JT 和 TH 也都比较高,而 DJ 和 GQ 微生物丰富度和多样性最低(图 2)。

与以往的研究相比(Zhang *et al.*, 2007; Yutin *et al.*, 2009; Zeng *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016),  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria 为优势类群,而我们的样本中细菌群落是由  $\alpha$ -Proteobacteria,  $\gamma$ -Proteobacteria,  $\beta$ -Proteobacteria,  $\delta$ -Proteobacteria, Bacilli 和 Planctomycetia 为主(图 4)。 $\alpha$ -Proteobacteria 已经被广泛研究(Alexandre *et al.*, 2008),它们在赤潮的时候有明显的增殖活动,在沿岸和大洋环境中为主流群体(Glöckner *et al.*, 1999; Pinhassi *et al.*, 2000; Eilers *et al.*, 2001; Alonso-Sáez *et al.*, 2007)。近年来,赤潮在 DJ 和 GQ 发生的频率比以往更高,可能与它们相对丰度降低有关,特别是当与  $\gamma$ -Proteobacteria 相比较的时候(Teira *et al.*, 2007)。另一方面,曾经有几个  $\alpha$ -Proteobacteria 丰度增大的情况,例如 *Roseobacter-like* 细菌丰度随着正烷烃的增加而增大(McKew *et al.*, 2007)。虽然一些报告已经描述过从烃污染海洋环境中分离  $\alpha$ -Proteobacteria 的分类,但还是难以确认这些微生物是否能够降解或利用烃。一项对印度尼西亚海水中烃类降解菌的研究显示,属于 Sphingomonadales 和 Rhodobacterales 的不同的海洋  $\alpha$ -Proteobacteria 属的细菌参与了脂肪族和低分子量芳烃的降解过程(Harwati *et al.*, 2007)。值得注意的是,在波罗的海北部夏季分层条件下,当细菌的生长受养分可利用性的限制时,*Sphingomonas* 属种类占浮游细菌的主导地位(Pinhassi *et al.*, 2000)。巧合的是这两种类型的细菌在各采样位点均被发现并鉴定出,而最高是 LH,其原因可能是因为它位于与许多有机污染物的污水区域。

一些结果表明,属于 Rhodobacteraceae 的 AAPB 在沿岸海域具有非常重要的影响。类似的结果,在贫营养的西太平洋(Zheng *et al.*, 2015)和极地沿海地区(Zeng *et al.*, 2016)也有发现,这表明 AAPB 更喜欢高透光的表层海水。属于 Rhodobacteraceae 科的 *Loktanella* 和 *Roseobacter* 两个属的 AAPB 在所有的采样站点中都处于优势地位,而在细菌属的分类水平上,ZJJ 和 JT 比其它样本具有更高的多样性(图 3)。*Roseobacter* 进化枝在海水中的广泛分布已经通过多种分子技术得到证实(Schmidt *et al.*, 1991; González *et al.*, 1997; Lanoil *et al.*, 2000),这些生物体是海洋浮游细菌的一个重要组成部分(Giovannoni, 2000)。目前,

仍然缺乏足够的知识去了解这一群体在海洋环境中的作用和功能。因此,需要全面的研究以提高我们对  $\alpha$ -Proteobacteria 在海洋环境中的降解生态位的理解。

在 JT 和 SJM 也被发现了  $\beta$ -Proteobacterial 群体(约占 3%),然而很少有在除了淡水环境和河口以外其它环境中发现  $\beta$ -Proteobacterial-like AAPB 序列的报道(Ritchie *et al.*, 2012)。Bouvier 等(2002)在两个河口发现了沿着盐度梯度变化的细菌群落组成,发现盐度是  $\beta$ -Proteobacteria 额外的控制因素。而伽玛变形菌的成员被认为是海洋表层水中的重要的代表细菌,这也就意味着它们能够快速生长并能迅速降解海洋中更容易被降解的有机成分(Pinhassi *et al.*, 2003; Poretsky *et al.*, 2005)。与以往的研究一致,它们在大西洋、波罗的海和北太平洋(Hu *et al.*, 2006; Masin *et al.*, 2006; Boeuf *et al.*, 2013)中占主导地位。在高纬度(>60°N, >60°S)和极地水域缺乏伽马变形菌的情况相对于全球性的分布趋势是一个例外,表明其成员无法在冰冷的海水环境中发展壮大(Koh *et al.*, 2011; Boeuf *et al.*, 2013)。依赖培养的和非培养的研究表明, AAPB 多样性体现在拥有许多  $\alpha$ -、 $\beta$ -和  $\gamma$ -Proteobacteria 的成员(Jeanthon *et al.*, 2011)。然而  $\delta$ -Proteobacteria 纲的 *Desulfocapsa* 属在 ZJJ 的发现,实属罕见。在先前的研究报道中,在石油污染潮下带沉积物中曾经发现过它的存在(Acosta-González *et al.*, 2013)。在 AAPB 的相关研究中,至今几乎很少有涉及到  $\delta$ -Proteobacteria 纲细菌的发现。究其原因,这可能与环境有关,ZJJ 属于捕捞区,基于 Azam 等(1994, 2007)提出了海洋微食物环的概念,捕捞区必定具有高丰度的浮游生物,从而相应地微生物种类和丰度也会更多。

基于非培养的分子技术,如荧光原位杂交技术(Fluorescence In Situ Hybridization, FISH),末端限制性片段长度多态性图谱技术(Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism, T-RFLP)和 *puf* 操纵子大量的插入克隆分析,拓展了我们对 AAPB 多样性和丰度的认识(Grüntzig *et al.*, 2002; Cottrell *et al.*, 2006)。与传统的基于分离培养的数据相比,在不同类型的功能区, AAPB 含有  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\delta$ -和  $\gamma$  类的变形菌,并支持 AAPB 多样性远不止两个容易被培养的 *Erythrobacter* 和 *Roseobacter* 属这一观点。尽管已经有许多关于 AAPB 在不同的地理位置和营养条件下的群落结构的研究(Zeng *et al.*, 2009; Lehours *et al.*, 2010),但尚未发现有沿着各种类型海洋功能区的



AAPB 分布的研究。我们探索了 AAPB 在不同功能区域表层海水的分布, 利用基于 *pufM* 基因的高通量测序的数据。共得到 32 个明确分类的属和 7 个属于 Proteobacteria 纲未分类的属(图 3), 而大多数 OTU 属于未明确分类的 AAPB 的分支。这些属分别被划分为 16 科、15 目、6 纲和 3 门。在结果中, 丰度和多样性相对较高的是变形杆菌, 其中也包含了大多数纲、目和科, 其次是厚壁菌门和浮霉菌门(表 3)。尤其是属于  $\delta$ -Proteobacteria 的 *pufM* 基因的发现, 使我们确信 AAPB 多样性的复杂程度远远超出目前所了解的情况。

温度是促进 AAPB 生长的一个重要环境因素(Masín *et al*, 2006; Ferrera *et al*, 2014; Koblížek, 2015; Lew *et al*, 2015)。巴伦支海的数据呈现强烈的线性相关性, 在温度最高时 AAPB 的丰富度和多样性最高(Lehours *et al*, 2015)。然而, 在极度贫营养的寒冷的高山湖泊, 电导率、pH 值、硝酸盐含量是影响 AAPB 群落结构分布和生长的主要因素(Koblížek, 2015)。在我们的研究中, *Roseobacter* 属在 LH 的丰度最高, 这可能表明温度是某些 *Roseobacter* 属细菌生长的至关重要条件。AAPB 的丰度与 pH 值在我们研究的范围内呈正相关, pH 值显著影响阿加西斯泥炭地冰川湖细菌群落的组成和纽约阿迪朗达克公园物种多样性和丰富度(Frischer *et al*, 2008, Lin *et al*, 2012)。AAPB 的丰度也可能直接或间接地受到其它因素(如水化学性质和 pH 值)的影响。水的 pH 值也可能会显著改变原生生物和植食性浮游动物的组成。已有研究证明, AAPB 经常处在激烈的被捕食的压力下, 植食性浮游动物群落的改变可能也会严重影响 AAPB 的数量(Ferrera *et al*, 2011)。另一个关键的环境因素是盐度, 它对海洋微生物的生长也有至关重要的影响。据报道, 在特拉华河口和北冰洋西部的 AAPB 受到环境盐度变化影响(Waidner *et al*, 2008; Boeuf *et al*, 2013), 但这种影响关系在本研究中未发现。虽然盐度变化很大(表 1), 在这些变化下的背后可能生存着许多具有相应生理耐受性的 AAPB 种群。可能的原因是, 不同盐度的水域之间, 光线充足时, 光合异养可能在温暖、高盐度的水和寒冷、低盐度的水中具有不同的生理作用。除了温度以外, 不同的盐度也导致 ZJJ 的 *pufM* 多样性高于 JT 和 LH。

Zohary 和 Robarts 得出结论认为, 冬季在地中海东部, 磷是细菌和浮游植物大面积生长的最主要的限制性营养物质(Zohary *et al*, 1998)。同样, 在夏天的地中海西北面水域, 磷的限制性作用也很常见

(Zweifel *et al*, 1993, Sala *et al*, 2002)。此外, AAPB 是一类快速生长代谢活跃的生物, 它们极大地促进了溶解氧的补充。我们可以得出结论认为, DO 是影响许多细菌属分布的一个重要因素(图 6)。另外, 从采样站点 *pufM* 基因的 OTU 分类结果表明, AAPB 特有分支与特定环境条件有关。这些结果表明观察到的 AAPB 丰度的变化往往也会伴随着种群的遗传多样性变化(图 5)。从属的分布情况来看, *Isosphaera*、*Maritimibacter*、*Desulfocapsa*、*Thiorhodococcus*、*Klebsiella* 和 *Amphritea* 这几个属只在朱家尖(ZJJ)被发现, *Ahrensia*、*Blastomonas* 和 *Methyloversatilis* 仅属于金塘岛(JT), *Sulfitobacter* 和 *Elioraea* 只在六横岛(LH)存在, 而 *Novosphingobium* 也仅在桃花岛被发现(TH), *Limnohabitans* 和 *Rubrivivax* 只存在于沈家门(SJM)(表 4)。它们的生理适应和代谢灵活的本性表明了光能异养为其提供了选择性的优势。所有的物理和化学因素都可能在构建 AAPB 种群结构时起到单独或协同作用。数据表明, 不同的 AAPB 群体被各种复杂的环境因素所控制, 这或许可以解释为什么目前很难准确预测水生环境总 AAPB 分布的问题。

## 参 考 文 献

- 陈 晨, 2014. 内蒙古高原湖泊好氧不产氧光合细菌的分离及其脱氮活性分析和脱氮功能基因的检测. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文
- 胡耀华, 2006. 代表性海区好氧不产氧光合细菌的光合基因(*pufM*)生态分布特征, 厦门: 厦门大学硕士学位论文
- Achenbach L A, Carey J, Madigan M T, 2001. Photosynthetic and phylogenetic primers for detection of anoxygenic phototrophs in natural environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7): 2922—2926
- Acosta-González A, Rosselló-Móra R, Marqués S, 2013. Characterization of the anaerobic microbial community in oil-polluted subtidal sediments: aromatic biodegradation potential after the *Prestige* oil spill. *Environmental Microbiology*, 15(1): 77—92
- Alexandre A, Laranjo M, Young J P W *et al*, 2008. *dnaJ* is a useful phylogenetic marker for alphaProteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(Pt 12): 2839—2849
- Allgaier M, Uphoff H, Felske A *et al*, 2003. Aerobic anoxygenic photosynthesis in *Roseobacter* clade bacteria from diverse marine habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9): 5051—5059
- Alonso-Sáez L, Balagué V, Sà E L *et al*, 2007. Seasonality in bacterial diversity in north-west Mediterranean coastal waters: assessment through clone libraries, fingerprinting and FISH. *FEMS Microbiology Ecology*, 60(1): 98—112
- Atamna-Ismael N, Finkel O, Glaser F *et al*, 2012. Bacterial

- anoxygenic photosynthesis on plant leaf surfaces. *Environmental Microbiology Reports*, 4(2): 209—216
- Azam F, Malfatti F, 2007. Microbial structuring of marine ecosystems. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10): 782—791
- Azam F, Smith D C, Steward G F *et al*, 1994. Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microbial Ecology*, 28(2): 167—179
- Béjà O, Suzuki M T, Heidelberg J F *et al*, 2002. Unsuspected diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Nature*, 415(6872): 630—633
- Beatty J T, 2005. On the natural selection and evolution of the aerobic phototrophic bacteria. In: Govindjee, Beatty J T, Gest H *et al*, eds. *Discoveries in Photosynthesis*. Netherlands: Springer, 1099—1104
- Boeuf D, Cottrell M T, Kirchman D L *et al*, 2013. Summer community structure of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the western Arctic Ocean. *FEMS Microbiology Ecology*, 85(3): 417—432
- Bouvier T C, del Giorgio P A, 2002. Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. *Limnology and Oceanography*, 47(2): 453—470
- Bryant D A, Frigaard N U, 2006. Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *Trends in Microbiology*, 14(11): 488—496
- Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J *et al*, 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5): 335—336
- Cho J C, Stapels M D, Morris R M *et al*, 2007. Polyphyletic photosynthetic reaction centre genes in oligotrophic marine GammaProteobacteria. *Environmental Microbiology*, 9(6): 1456—1463
- Cooney M J, Johnston W A, Pohl S *et al*, 2006. Influence of photoperiod on pigmentation and metabolic efficiency of the marine aerobic anoxygenic photosynthetic bacterium *Erythrobacter longus* Strain NJ3Y. *Aquatic Microbial Ecology*, 43(3): 303—309
- Cottrell M T, Mannino A, Kirchman D L, 2006. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the Mid-Atlantic bight and the North Pacific Gyre. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1): 557—564
- Cottrell M T, Kirchman D L, 2009. Photoheterotrophic microbes in the Arctic Ocean in summer and winter. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(15): 4958—4966
- Cottrell M T, Ras J, Kirchman D L, 2010. Bacteriochlorophyll and community structure of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in a particle-rich estuary. *The ISME Journal*, 4(7): 945—954
- Csotonyi J T, Swiderski J, Stackebrandt E *et al*, 2010. A new environment for aerobic anoxygenic phototrophic bacteria: biological soil crusts. *Environmental Microbiology Reports*, 2(5): 651—656
- Eilers H, Pernthaler J, Peplies J *et al*, 2001. Isolation of novel pelagic bacteria from the German bight and their seasonal contributions to surface picoplankton. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(11): 5134—5142
- Ferrera I, Borrego C M, Salazar G *et al*, 2014. Marked seasonality of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the coastal NW Mediterranean Sea as revealed by cell abundance, pigment concentration and pyrosequencing of *pufM* gene. *Environmental Microbiology*, 16(9): 2953—2965
- Ferrera I, Gasol J M, Sebastián M *et al*, 2011. Comparison of growth rates of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria and other bacterioplankton groups in coastal Mediterranean waters. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(21): 7451—7458
- García-Chaves M C, Cottrell M T, Kirchman D L *et al*, 2016. Single-cell activity of freshwater aerobic anoxygenic phototrophic bacteria and their contribution to biomass production. *The ISME Journal*, 10(7): 1579—1588
- Giovannoni S, Rappé M S, 2000. Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. In: Kirchman D L ed. *Microbial Ecology of the Oceans*. New York: Liss/Wiley, 47—84
- Glöckner F O, Fuchs B M, Amann R, 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8): 3721—3726
- Goericke R, 2002. Bacteriochlorophyll *a* in the ocean: is anoxygenic bacterial photosynthesis important?. *Limnology and Oceanography*, 47(1): 290—295
- González J M, Moran M A, 1997. Numerical dominance of a group of marine bacteria in the alpha-subclass of the class Proteobacteria in coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11): 4237—4242
- Grüntzig V, Stres B, del Rio H L A *et al*, 2002. Improved protocol for T-RFLP by capillary electrophoresis. Michigan: Center for Microbial Ecology, Michigan State University East Lansing
- Hallin S, Lydmark P, Kokalj S *et al*, 2005. Community survey of ammonia-oxidizing bacteria in full-scale activated sludge processes with different solids retention time. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3): 629—640
- Harwati T U, Kasai Y, Kodama Y *et al*, 2007. Characterization of diverse hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Indonesian seawater. *Microbes and Environments*, 22(4): 412—415
- Hu Y H, Du H L, Jiao N Z *et al*, 2006. Abundant presence of the  $\gamma$ -like Proteobacterial *pufM* gene in oxic seawater. *FEMS Microbiology Letters*, 263(2): 200—206
- Jeanthon C, Boeuf D, Dahan O *et al*, 2011. Diversity of cultivated and metabolically active aerobic anoxygenic phototrophic bacteria along an oligotrophic gradient in the Mediterranean Sea. *Biogeosciences*, 8(7): 1955—1970
- Jiao N Z, Zhang Y, Zeng Y H *et al*, 2007. Distinct distribution pattern of abundance and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the global ocean. *Environmental Microbiology*, 9(12): 3091—3099
- Koblížek M, 2015. Ecology of aerobic anoxygenic phototrophs in aquatic environments. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(6):

- 854—870
- Koblížek M, Falkowski P G, Kolber Z S, 2006. Diversity and distribution of photosynthetic bacteria in the Black Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 53(17—19): 1934—1944
- Koh E Y, Phua W, Ryan K G, 2011. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in Antarctic sea ice and seawater. *Environmental Microbiology Reports*, 3(6): 710—716
- Kolber Z S, Van Dover C L, Niederman R A *et al*, 2000. Bacterial photosynthesis in surface waters of the open Ocean. *Nature*, 407(6801): 177—179
- Kolber Z S, Gerald F, Plumley *et al*, 2001. Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science*, 292(5526): 2492—2495
- Labrenz M, Lawson P A, Tindall B J *et al*, 2005. *Roseisalinus antarcticus* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic bacteriochlorophyll *a*-producing  $\alpha$ -proteobacterium isolated from hypersaline Ekho Lake, Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(Pt 1): 41—47
- Lanoil B D, Carlson C A, Giovannoni S J, 2000. Bacterial chromosomal painting for in situ monitoring of cultured marine bacteria. *Environmental Microbiology*, 2(6): 654—665
- Lehours A C, Cottrell M T, Dahan O *et al*, 2010. Summer distribution and diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the Mediterranean Sea in relation to environmental variables. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(2): 397—409
- Lehours A C, Jeanthon C, 2015. The hydrological context determines the beta-diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in European Arctic seas but does not favor endemism. *Frontiers in Microbiology*, 6: 638
- Lew S, Koblížek M, Lew M, 2015. Seasonal changes of microbial communities in two shallow peat bog lakes. *Folia Microbiologica*, 60(2): 165—175
- Lew S, Lew M, Koblížek M, 2016. Influence of selected environmental factors on the abundance of aerobic anoxygenic phototrophs in peat-bog lakes. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(14): 13853—13863
- Lin X, Green S, Tfaily M M *et al*, 2012. Microbial community structure and activity linked to contrasting biogeochemical gradients in bog and fen environments of the Glacial Lake Agassiz Peatland. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(19): 7023—7031
- Losos J B, 1967. The theory of island biogeography. *Bioscience*, 18(3): 522—542
- Mašín M, Nedoma J, Pechar L *et al*, 2008. Distribution of aerobic anoxygenic phototrophs in temperate freshwater systems. *Environmental Microbiology*, 10(8): 1988—1996
- Mašín M, Zdun A, Ston-Egiert J *et al*, 2006. Seasonal changes and diversity of aerobic anoxygenic phototrophs in the Baltic Sea. *Aquatic Microbial Ecology*, 45(3): 247—254
- McKew B A, Coulon F, Osborn A M *et al*, 2007. Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK. *Environmental Microbiology*, 9(1): 165—176
- Moran M A, Miller W L, 2007. Resourceful heterotrophs make the most of light in the coastal ocean. *Nature Reviews Microbiology*, 5(10): 792—800
- Nagashima K V P, Hiraishi A, Shimada K *et al*, 1997. Horizontal transfer of genes coding for the photosynthetic reaction centers of purple bacteria. *Journal of Molecular Evolution*, 45(2): 131—136
- Nuyanzina-Boldareva E N, Akimov V N, Takaichi S *et al*, 2016. New strains of an aerobic anoxygenic phototrophic bacterium *Porphyrobacter donghaensis* isolated from a Siberian thermal spring and a weakly mineralized lake. *Microbiology*, 85(1): 77—86
- Percent S F, Frischer M E, Vescio P A *et al*, 2008. Bacterial community structure of acid-impacted lakes: what controls diversity?. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(6): 1856—1868
- Pinhassi J, Berman T, 2003. Differential growth response of colony-forming  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Proteobacteria in dilution culture and nutrient addition experiments from Lake Kinneret (Israel), the eastern Mediterranean Sea, and the Gulf of Eilat. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1): 199—211
- Pinhassi J, Hagström Å, 2000. Seasonal succession in marine bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 21(3): 245—256
- Poretsky R S, Bano N, Buchan A *et al*, 2005. Analysis of microbial gene transcripts in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7): 4121—4126
- Rathgeber C, Beatty J T, Yurkov V, 2004. Aerobic phototrophic bacteria: new evidence for the diversity, ecological importance and applied potential of this previously overlooked group. *Photosynthesis Research*, 81(2): 113—128
- Ritchie A E, Johnson Z I, 2012. Abundance and genetic diversity of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria of coastal regions of the Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8): 2858—2866
- Sala M M, Peters F, Gasol J M *et al*, 2002. Seasonal and spatial variations in the nutrient limitation of bacterioplankton growth in the northwestern Mediterranean. *Aquatic Microbial Ecology*, 27: 47—56
- Salka I, Moulisová V, Koblížek M *et al*, 2008. Abundance, depth distribution, and composition of aerobic bacteriochlorophyll *a*-producing bacteria in four basins of the central Baltic Sea. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(14): 4398—4404
- Schloss P D, Westcott S L, Ryabin T *et al*, 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23): 7537—7541
- Schmidt T M, DeLong E F, Pace N R, 1991. Analysis of a marine picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and

- sequencing. *Journal of Bacteriology*, 173(14): 4371—4378
- Schwalbach M S, Fuhrman J A, 2005. Wide-ranging abundances of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the world ocean revealed by epifluorescence microscopy and quantitative PCR. *Limnology and Oceanography*, 50(2): 620—628
- Shiba T, Simidu U, 1982. *Erythrobacter longus* gen. nov., sp. nov., an aerobic bacterium which contains bacteriochlorophyll *a*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 32(2): 211—217
- Suyama T, Shigematsu T, Takaichi S *et al*, 1999. *Roseateles depolymerans* gen. nov., sp. nov., a new bacteriochlorophyll *a*-containing obligate aerobe belonging to the  $\beta$ -subclass of the *Proteobacteria*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49 Pt 2: 449—457
- Teira E, Lekunberri I, Gasol J M *et al*, 2007. Dynamics of the hydrocarbon-degrading *Cycloclasticus* bacteria during mesocosm-simulated oil spills. *Environmental Microbiology*, 9(10): 2551—2562
- Waidner L A, Kirchman D L, 2005. Aerobic anoxygenic photosynthesis genes and operons in uncultured bacteria in the Delaware River. *Environmental Microbiology*, 7(12): 1896—1908
- Waidner L A, Kirchman D L, 2007. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria attached to particles in turbid waters of the Delaware and Chesapeake estuaries. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12): 3936—3944
- Waidner L A, Kirchman D L, 2008. Diversity and distribution of ecotypes of the aerobic anoxygenic phototrophy gene *pufM* in the Delaware estuary. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(13): 4012—4021
- Yurkov V, Beatty J T, 1998a. Isolation of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria from black smoker plume waters of the Juan de Fuca ridge in the Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1): 337—341
- Yurkov V V, Beatty J T, 1998b. Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*: MMBR, 62(3): 695—724
- Yutin N, Suzuki M T, B ej a O, 2005. Novel primers reveal wider diversity among marine aerobic anoxygenic phototrophs. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12): 8958—8962
- Yutin N, Suzuki M T, Teeling H *et al*, 2007. Assessing diversity and biogeography of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in surface waters of the Atlantic and Pacific Oceans using the Global Ocean Sampling expedition metagenomes. *Environmental Microbiology*, 9(6): 1464—1475
- Yutin N, Suzuki M T, Rosenberg M *et al*, 2009. BchY-based degenerate primers target all types of anoxygenic photosynthetic bacteria in a single PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23): 7556—7559
- Zeng Y X, Dong P Y, Qiao Z Y *et al*, 2016. Diversity of the aerobic anoxygenic phototrophy gene *pufM* in Arctic and Antarctic coastal seawaters. *Acta Oceanologica Sinica*, 35(6): 68—77
- Zeng Y H, Shen W, Jiao N Z, 2009. Genetic diversity of aerobic anoxygenic photosynthetic bacteria in open ocean surface waters and upper twilight zones. *Marine Biology*, 156(3): 425—437
- Zhang L, Gao G, Tang X M *et al*, 2016. Pyrosequencing analysis of bacterial communities in Lake Bosten, a large brackish inland lake in the arid northwest of China. *Canadian Journal of Microbiology*, 62(6): 455—463
- Zhang Y, Jiao N Z, 2007. Dynamics of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria in the East China Sea. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(3): 459—469
- Zheng Q, Liu Y, Steindler L *et al*, 2015. Pyrosequencing analysis of aerobic anoxygenic phototrophic bacterial community structure in the oligotrophic western Pacific Ocean. *FEMS Microbiology Letters*, 362(8): fmv034
- Zohary T, Robarts R D, 1998. Experimental study of microbial P limitation in the eastern Mediterranean. *Limnology and Oceanography*, 43(3): 387—395
- Zweifel U L, Norrman B, Hagstr om  A, 1993. Consumption of dissolved organic carbon by marine bacteria and demand for inorganic nutrients. *Marine Ecology Progress Series*, 101(1—2): 23—32

## STRUCTURE OF AEROBIC ANOXYGENIC PHOTOTROPHIC BACTERIAL COMMUNITY IN ZHOUSHAN ARCHIPELAGO, EAST CHINA SEA

ZHAO Ben-Xuan<sup>1,2</sup>, ZHAO Sheng<sup>1,2</sup>, LI Ru-Wei<sup>1,2</sup>, LIU Qiang<sup>1,2</sup>, WU Chang-Wen<sup>1,2</sup>

(1. Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhoushan 316022, China)

**Abstract** Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria (AAPB) is a functional bacterial group featuring aerobic and facultative photoheterotrophic abilities and distributes widely. Samples were collected in surface seawater (0.5m) from the Zhoushan Archipelago of the East China Sea in 8 sites representative of 8 functional zones: in April 2016. Water temperature ranged 13.8—17.2°C and pH 7.65—7.92. Compositions of AAPB community were studied using high-throughput sequencing based on *pufM* gene. In addition, salinity and dissolved oxygen (DO) were measured in situ and concentrations of inorganic nutrients were determined spectrophotometrically. Diversity index was calculated based on OTU with Mothur and hierarchical clustering of all libraries was built with Qiime. Taxonomic classification was performed using local Blast with BioEdit. Redundancy analysis (RDA) was carried out using Canoco with the Monte Carlo permutations test. Results show that DO and salinity in Gouqi Island were higher than those of other sites as it was the farthest island offshore. Salinity, concentration of inorganic nitrogen, and total phosphorus fluctuated largely among stations. The community richness of AAPB was in high level as indicated by Shannon and Simpson indices. In total, 192 633 clean reads were obtained for 7 stations (except Station DS that failed to read), and they fell into 4051 OTUs (97% cut-off value). A total of 32 genera and 7 unclassified genera of Proteobacteria were found. They could be classified into 16 families, 15 orders, 6 classes, and 3 phyla, of which *Roseobacter* was dominant genus and *Desulfocapsa* in Station ZJJ was found for the first time. In abundance and diversity, Proteobacteria ranked the first, followed by Firmicutes and the Planctomycetes. DO and pH were the first and second factors on most of the genera of bacteria as indicated in RDA analysis on microbiological data and environmental parameters. The community structure of AAPB presented different distribution patterns in the Zhoushan Archipelago, and the diversity of AAPB varied with local environmental factors. Therefore, predicting the distribution of total AAPB in aquatic content would be difficult.

**Key words** aerobic anoxygenic phototrophic bacteria (AAPB); high-throughput sequencing; diversity